

# BUSCA, VALIDAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATO DE *Ananas comosus* var *erectifolius* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS

**Diego Mota da Costa<sup>1</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>2</sup>; Juliana Azevedo da Paixão<sup>3</sup>  
Caroline Issler Rodrigues<sup>4</sup> Jéssica Lima de Souza<sup>5</sup> Fernanda Vidigal Duarte de  
Souza<sup>6</sup> Everton Hilo de Souza<sup>7</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: diegocost@live.com
2. Orientador, Departamento de nome, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugo@uefs.br
3. Doutoranda em Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, e-mail: juli.azevedo87@gmail.com
4. Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carol.issler@gmail.com
5. Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jessica\_uefs2011@hotmail.com
6. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brasil. fernanda.souza@embrapa.br
7. Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Cruz das Almas, Brasil. hilosouza@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Fenólicos; CLAE; Bromeliaceae.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de fonte inestimável de recursos naturais para obtenção de fármacos, ainda que, nossas espécies nativas tenham sido pouco estudadas quanto ao potencial farmacológico (FRIAS, 2011). Uma família muito presente no território brasileiro é a Bromeliaceae. Segundo Luther, (2012), inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies, que são divididas em subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae. O Brasil abriga cerca de 40% do total de espécies de Bromeliaceae, sendo 40 gêneros registrados no território nacional. A espécie mais conhecida é o *Ananas comosus* (L.) Merr., conhecido como abacaxi, uma das frutas tropicais mais consumida mundialmente. Comumente, algumas das plantas desta família são utilizadas para tratamento de diversas afecções, como: bronquites, aftas, tosse e inflamações em geral. Além de existir relatos da presença de bromelina, proteases de cisteína, metabólitos secundários como: triterpenos, esteroides, flavonoides, gliceróis, derivados do ácido cinâmico, entre outros (MANETTI, 2009).

O uso dessa espécie é variado, desde suas fibras (LEÃO et al., 2009), como ornamental (SOUZA et al., 2014), fitoterapia (SUN et al., 2002) até para produção de biocombustíveis (HOSSAIN et al., 2008). A necessidade de estudos sobre espécies de *Ananas* pode otimizar e melhorar processos de produção envolvendo as substâncias provenientes dessas espécies.

Considerando-se a grande variedade de compostos bioativos presentes na espécie, justifica-se o presente trabalho pela importância em quantificar os compostos fenólicos da mesma, contribuindo com a quimiossistemática das espécies e possibilitando o desenvolvimento futuro de novos produtos farmacêuticos.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi quantificar o ácido *p*-cumárico no extrato acetato das folhas de *Ananas comosus* var *erectifolius* por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), contribuindo com a quimiossistemática do gênero estudado.

## MATERIAL E MÉTODOS

A espécie foi coletada na EMBRAPA Cruz das Almas – BA em agosto de 2016, e após coleta, esse material foi encaminhado para o Laboratório de Extração no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. O material foi submetido à secagem em estufa a  $(45 \pm 3)$  °C, durante 15 dias, até peso constante. Após a secagem, as folhas foram moídas em liquidificador industrial. A extração foi realizada através do método de maceração, utilizando metanol como solvente, com troca a cada 3 dias, sendo essa operação repetida por 5 vezes. Os filtrados obtidos, foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, com banho em temperatura de  $(45 \pm 3)$  °C. Após a obtenção do extrato metanólico seco, esse extrato foi submetido à partição com solventes de diferentes polaridades e foram obtidos os extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila.

As determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Varian, consistindo de bomba Varian Polaris, detector de arranjo de diodo Varian ProStar e injetor manual. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré- coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5µm) da Merck®.

As condições de análise foram com gradiente de eluição conduzido com fase móvel de solução de ácido acético 0,7% (fase aquosa) e solução de ácido acético 0,7% com acetonitrila (MeCN) na proporção 2:8 v/v (fase orgânica), em diferentes proporções durante a corrida cromatográfica. O volume de injeção foi de 20 µL. O equipamento foi operado à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e o método utilizado foi adaptado de Cíková e colaboradores (2008). A leitura do detector de arranjo de diodo foi na faixa de 220 a 400 nm e a aquisição cromatográfica definida em 280 nm.

A identificação dos compostos foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e do gráfico de absorvância no ultravioleta com os padrões, aliado aos dados de literatura e a quantificação dos compostos foi feita por correlações das curvas de calibração com os padrões através de injeções triplicatas seguindo os métodos anteriores de análise.

O método foi validado de acordo com a ANVISA (Brasil, 2003), avaliando-se Especificidade/Seletividade, Linearidade, Intervalo, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) (BRITO et al, 2003). A precisão foi avaliada pelo teste de repetibilidade. O teste foi realizado com três diferentes concentrações de soluções padrão (SHEKARCHI et al, 2010). A exatidão deste método foi determinada pelo teste de recuperação. Teste de recuperação foi executado pelo método de adição de padrão em uma matriz isenta. Os dados podem ser encontrados na Tabela 1.

## RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

### *Validação de método*

A curva de calibração foi construída através da representação gráfica da área do pico em função da concentração da substância. A equação de regressão foi obtida a partir da curva de calibração para investigar linearidade. Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) em condições de cromatografia foram determinados pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração. As curvas de calibração exibiram coeficiente de correlação ( $R^2$ ) acima de 0,99, podendo ser observado nas figuras 1A. A Figura 1B mostra o cromatograma resultante do ensaio de calibração com uma injeção de 20 µL de uma solução de ácido *p*-cumárico em concentração na faixa de 0,01 – 0,25mg/mL, que apresentou tempo de retenção 8,2 minutos.

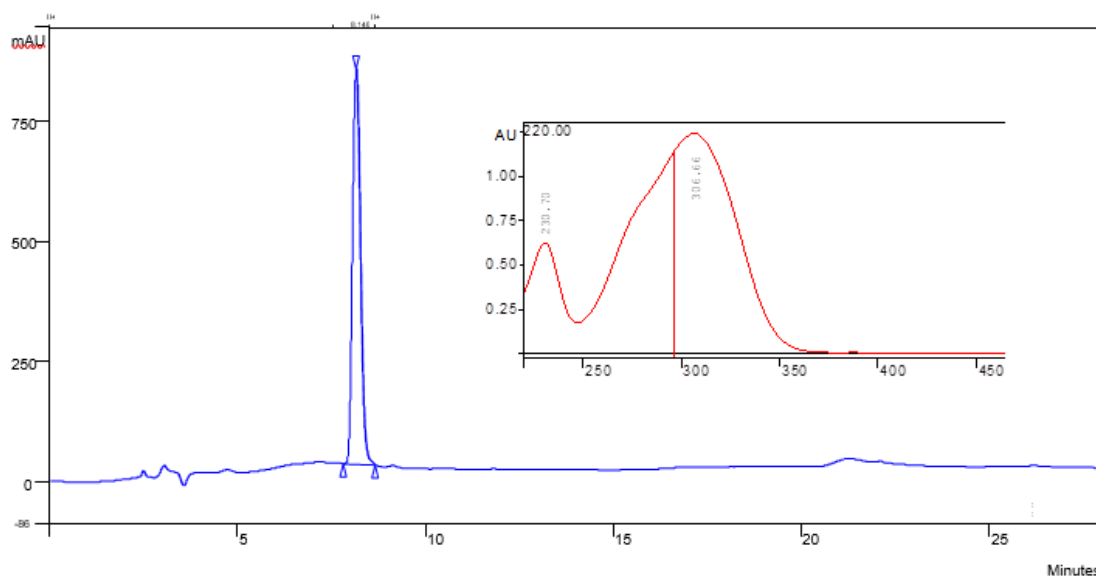


Figura 1. Cromatograma da solução de calibração de Ácido *p*-cumárico.

Tabela 1: Resultados da validação da quantificação do ácido *p*-cumárico no extrato acetato.

Parâmetro	Ácido <i>p</i> -cumárico
Linearidade ( $R^2$ )	0,997
Precisão (%)	0,1 – 0,7
Exatidão (%)	83,9 – 117
Limite de Detecção (LD)	0,003
Limite de Quantificação (LQ)	0,010

#### Quantificação de ácido *p*-cumárico

Compostos fenólicos são produtos naturais que apresentam em seu esqueleto um anel aromático ligado a uma hidroxila funcional, sendo um grupo muito amplo de compostos. Apresentam diversas atividades nos vegetais, como polinização, deterência e proteção contra raios UV e funções farmacológicas, como atividades antioxidante, anti-inflamatória (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dentre os compostos fenólicos, existem classes de metabólitos secundários importantes, com flavonoides e taninos (TAIZ; ZEIGER, 2013). O ácido *p*-cumárico é um ácido hidroxicinâmico precursor da síntese de metabólitos secundários, como os flavonoides. Dessa forma, está presente na maior parte das espécies vegetais e existem relatos de sua identificação em amostras de folhas e frutos de *Ananas comosus*. Na espécie em questão foi encontrado nos extratos acetato de etila e clorofórmio nas concentrações de 6,11 e 5,71  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extrato, respectivamente.

Segundo trabalho realizado por Ma (2007), a caracterização química das folhas de *Ananas comosus*, utilizando HPLC/DAD/MS identificou 26 componentes, dentre eles,

ácidos fenólicos como o ácido *p*-cumárico, fenilpropanos, fenilpropanoides e flavonas, além de ter suas estruturas elucidadas. Em outro estudo realizado por Yapo, (2011) foi avaliado o perfil de fenólicos do fruto de *Ananas comosus* de diferentes origens com o objetivo de avaliar a qualidade dos frutos, foram encontrados a presença de diferentes ácidos fenólicos e flavonoides: ácido gálico, ácido sirínico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido isoferúlico, ácido *p*-cumaroilquínico, ácido *o*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, epicatequina, quercetina, dentre outros, o que corrobora com os perfis encontrados no estudo realizado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente trabalho foi possível realizar a validação do método, satisfazendo todos os parâmetros exigidos pela ANVISA. Devido a sua sensibilidade, é possível identificar e quantificar o ácido *p*-cumárico em baixas concentrações. Tal método mostra-se, então, como uma alternativa na avaliação dos teores de ácido *p*-cumárico em *Ananas comosus* var *erectifolius*, podendo ser utilizado em estudos que visam avaliar a variação desse ácido fenólico em plantas obtidas por diferentes formas de cultivo.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2003. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003.
- CÍCHOVÁ, M., et al. 2008. Influence of Tannin Addition on the Content and Composition of Polyphenolic compounds in Wines. **Czech Journal of Food Science**. 26: S33–S38.
- FRIAS, U. A.; COSTA, M. C. M.; TAKAHASHI J. A. 2011. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.16(1): 60-71.
- HOSSAIN, A. B. M. S.; SALEH, A. A.; AISHAH, S.; BOYCE, A. N.; CHOWDHURY, P. P.; NAQUIDDIN, M. 2008. **Bioethanol Production from Agricultural Waste Biomass as a Renewable Bioenergy Resource** in Biomaterials. IFMBE Proceedings, v. 21, parte 3, p. 300-305.
- LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. 2009. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 822: 227-238.
- MA, C. XIAO, S. Y.; LI, Z. G.; WANG, W.; DU, L. I. 2007. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, n. 1165: 39-44.
- MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. 2014. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.
- SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Selection and use recommendation in hybrids of ornamental pineapple. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45: 409-416.
- SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. H. 2002. **Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50: 7449- 7454.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.
- YAPO, E. S; KOUAKOU, H. T.; KOUAKOU, L. K.; KOUADIO, J. Y.; KOUAMÉ, P.; Mérillon, J. M. 2011. Phenolic profiles of pineapple fruits (*Ananas comosus* L. Merrill) Influence of the origin of suckers. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n.6: 1372-1378.